晚期肺癌患者药物治疗前后尿蛋白质组的变化

张亚萌[1]，衡姊琦[1]，魏静[1]，王颖轶[2*]，高友鹤[1*]

[1] 北京师范大学基因工程药物及生物技术北京市重点实验室，北京　100875

[2] 中国医学科学院北京协和医院肿瘤内科，北京　100730，

摘要

肺癌作为一种严重威胁人类生命健康的疾病，尽管治疗方法种类较多，但如何把握治疗时机，为患者确定最有效的治疗用药仍然是一个难题。尿液蛋白质组可以敏感的反映机体的生理变化，有希望反映药物治疗后机体的病理或生理变化。为了研究晚期肺癌患者使用不同的药物进行治疗时其尿液蛋白质组的变化情况，通过收集晚期肺癌患者治疗前后的不同时间的尿液样本，使用液相色谱联用质谱（LC-MS / MS）来检测其尿蛋白组的变化。比较结果发现，当不同的患者使用不同药物治疗后，差异蛋白的变化各不相同，其差异蛋白反映的生物学过程变化和患者的临床表现变化较为一致。这项研究结果表明，（1）能够通过尿蛋白的变化反映不同药物治疗后患者的病理生理变化；（2）当不同患者使用相同药物治疗后，尿蛋白的变化能够反映出患者体内不同的病理生理变化，且和患者的临床病情评估结果较为一致。这些发现有可能为辅助临床治疗提供重要信息。

关键词：**肺癌；尿液蛋白质组；药物治疗；病理生理变化**

1. 介绍

近年来，肺癌的发病率及死亡率在全球范围内呈现迅速增长的趋势，已经成为威胁人类生命健康的重要杀手。据报道，肺癌是最常被诊断出的癌症（11.6%），也是引起癌症死亡的主要原因（占癌症死亡总数的 18.4%）[1]，它是全球的男性和女性中第二常见的癌症，同时也是中国人群中最为常见的癌症[2,3]。其中，非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）和小细胞肺癌（small cell lung cancer，SCLC）是两种主要的组织学亚型，NSCLC 是最常见的亚型的肺癌，占约占所有肺癌的 83%[4]。

肺癌的治疗选择包括手术，放射疗法，化学疗法，靶向疗法和免疫疗法。治疗方法的选择取决于多种因素，包括癌症的类型和阶段[5]。在目前晚期肺癌的临床疗法中，铂类疗法是晚期肺癌的标准治疗方法，铂类联合化疗在生存率和症状控制方面具有较好的优势，然而，它们的临床有效性受到累积的血液和神经毒性的限制需要寻找替代治疗[5]。在副反应方面，卡铂引起最多的是血小板减少症，顺铂引起最多的是恶心、呕吐。因此，铂类化合物的选择应考虑预期的毒性特征，

基金项目：国家重点研发计划课题(2018YFC0910202；2016YFC1306300)；国家自然科学基金（81472785；61435001；81972698）；北京自然科学基金（7173264）；中国医学科学院医学与健康科技创新工程（2017-I2M-4-002；2016-I2M-1-001））；北京协和医学院青年基金（2017320001）；北京合作建设项目(110651103)；北京师范大学 (11100704)；北京协和医院(2016-2.27)；
通信作者:高友鹤（1964.06-），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物。 E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn；王颖轶（1977.01-），男，副教授，硕士生导师，主要研究方向：专业擅长肺癌尤其是非小细胞肺癌，包括基因检测，靶向药物，最新的免疫治疗的诊断和治疗，晚期肺癌临床预后与药物疗效相关，E-mail: wangyingyi@pumch.cn。

患者的合并症和偏好[6]。血管生成抑制剂（即贝伐单抗）是有前途的可个性化治疗肺癌的有效途径。贝伐单抗作为肺癌常用治疗药物，可促进肿瘤细胞凋亡，但研究发现在临床应用中有一定的毒副作用，常见的副作用如高血压[7]，出血[8]和蛋白尿[9]等。在免疫疗法中，帕姆单抗作为迅速发展的免疫检查点抑制剂中的一员，被批准用于晚期非小细胞肺癌的一线治疗[10]。但是由免疫治疗引起的免疫相关不良反应可累及各个系统，有报道称帕姆单抗治疗组患者出现了甲状腺功能异常、肺炎和严重的皮肤反应等[11]。部分患者经临床靶向治疗后会出现不同程度的耐药性，进一步影响临床预后。综合这些临床治疗面临的问题，如何为每位患者确定最有效的治疗用药，选择合适的治疗方法以及不同方法的联合应用，尽可能的把握治疗时机，在提供最佳的治疗效果同时并减少副作用是现今临床治疗面对的一个不能忽视的挑战。

尿液蛋白质组可以敏感的反映机体的生理变化。由于缺乏稳态机制的调节，尿液可以在早期积累全身的变化[12]。许多研究表明，通过比较尿蛋白质组的变化，能够为许多疾病的早期诊断提供线索，例如心肌炎模型[13]，阿尔兹海默模型[14]，肝纤维化模型[15]，胶质瘤模型[16]，肺纤维化模型[17]，慢性胰腺炎模型[18]。除此之外，尿液蛋白质组可以敏感的区分出更细微的差别，据报道尿蛋白有潜力反映相同的肿瘤细胞生长在不同器官时体内的变化[19]；尿蛋白质组也可以敏感的反映极少数细胞注射到大鼠皮下时引起机体的变化[20]。我们猜测尿液蛋白质组的潜力不止如此。理论上讲，如果比较同一个人不同时期的尿液样本，并假设该时期内此人没有明显的生活方式变化，那么尿液的变化应该反映了此人这段时间内的生理或病理变化。仔细分析许多不同效果和不同副作用的药物引起的尿蛋白变化，可能有助于为患者提供疾病相关通路和生物过程的线索，包括帮助其选择避免会带来不良副作用的药物[21]。

因此，在本研究中我们收集了 8 位晚期肺癌患者治疗前后的尿液，并对尿液样本进行数据非依赖型质谱数据采集非标记定量分析，每位患者选择自身对照比较其尿蛋白质组的差异。这项研究旨在发现当晚期肺癌患者使用不同的药物进行治疗时，在治疗的不同阶段其尿液蛋白质组反映的病理生理学变化是否和临床表现变化一致，并且探索尿液蛋白质组区分不同药物引起生物学变化的能力。

2.材料和方法

2.1 患者样本

总共收集了来自北京市协和医院的 8 位晚期肺癌患者（即不可切除的 IIIB-IV 期的患者）的 23 个尿液样本，尿液样本均为晨尿。所有患者的临床资料总结于表 1。肺癌分期根据第八版国际肺癌 TNM 分期标准[22]。患者的病情评估标准参照 RECIST 1.1[23]。所有参与者均已签署知情同意书并从参与本研究的医院获得伦理学批准。

表 1 8 例肺癌患者的基本临床特征

患者编号	临床特征			
	年龄	性别	癌症类型	临床分期
P1	53	男	肺腺癌	IVA
P2	62	男	左上肺浸润性腺癌	IVA
P3	83	男	右肺中分化鳞癌	IIIB
P4	53	男	左肺中分化鳞癌	IIIB
P5	64	男	大细胞神经内分泌癌	IIIB
P6	59	女	右上肺腺癌	IVA
P7	70	女	肺低分化腺癌	IVA
P8	64	男	肺腺癌	IVA

2.2 尿液样品收集和制备

收集所有患者用药前后不同时间点的尿液样品，具体时间和用药情况见表 3 至表 10。尿液样本离心除去细胞碎片和杂质后暂时储存在-80°C 冰箱备用。在进行 LC-MS / MS 分析之前，取 20ml 样品解冻并离心 30 分钟，然后将上清液转移至新的离心管中与三倍体积的预冷乙醇充分混合，并在-20°C冰箱内静置沉淀 12 小时提取尿蛋白。然后弃去上清液，干燥沉淀并添加制备的裂解缓冲液（8 mol / L 尿素，2 mol / L 硫脲，50 mmol / L Tris 和 25 mmol / L DTT）复溶。复溶的样品离心后保留上清液，通过 Bradford 测定法测量蛋白质浓度。使用 FASP 方法将尿蛋白膜上辅助酶切 [24]。每个样品取 100μg 添加到 10kD 滤器上（Pall, Port Washington, NY, USA）中，然后制备尿素缓冲液（UA，8 mol / L 尿素，0.1 mol / L Tris-HCl，pH 8.5 ）和 25 mmol / L NH4HCO3 溶液，按顺序洗涤尿蛋白质数次。然后添加 100ul 的 NH4HCO3 溶液和二硫苏糖醇（DTT，Sigma）至终浓度为 20 mmol / L， 37°C 下还原 1 小时。现配碘乙酰胺（IAA，Sigma），然后在黑暗中添加至终浓度为 50 mmol / L 碘乙酰胺（IAA，Sigma），避光放置 30 分钟。将样品离心 40 分钟后，再次添加 UA 和 NH4HCO3 洗涤蛋白质几次，然后向蛋白质中添加胰蛋白酶（酶与蛋白质的比例为 1:50），在 37°C 下过夜酶解，收集酶解后的滤液即为多肽混合物。将收集的多肽混合物用 Oasis HLB 固相萃取柱（Waters，Milford，MA）除盐并真空干燥，放置-80°C 冰箱中标记并储存。

2.3 LC-MS / MS 分析

对所有样品进行数据依赖（DDA）质谱数据采集。将冻干后的肽段样品取出，加入 0.1%甲酸（FA）稀释肽段浓度至 0.5μg/μL，通过 BCA 测定法确定肽段浓度。每种肽样品取 2μL。液相设置：样品进入自动加样器，以 3μL/ min 流速平衡 Trap 柱 4min，随后以 0.25μL/ min（柱流速）进行反向洗脱，流动相 B 的洗脱梯度为 4%至 28%，时间为 90min。洗脱下来的多肽采用 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪（Thermo Fisher Scientific，USA）进行检测。使用以下参数获取 MS 数据：喷雾电压 2.4 kV，离子转移管温度 320°C。一级质谱参数：

350-1550 m/z，分辨率 60,000；二次扫描：200-2000 m/z，分辨率 30000，循环时间 3s，最高速度模式，30％的 HCD 碰撞能量。

2.4 数据分析

使用 Proteome Discoverer 软件（版本 2.1，Thermo Fisher 公司）将质谱仪采集到的数据 raw 文件转为 mgf 格式文件。将 mgf 文件使用 Mascot 软件（版本 2.4.1）进行数据库检索，使用 SwissProt 数据库（分类法：Homo；包含 20346 个序列）。搜索条件包括：胰酶酶切，最多允许 2 个漏切位点，半胱氨酸的氨酰甲基化修饰为固定修饰，甲硫氨酸的氧化修饰为可变修饰，母离子质量容差为 10 ppm。碎片离子质量容差为 0.02 Da。检索完成后，导出 dat 格式文件。将 dat 格式文件导入 Scaffold 软件（版本 4.7.5），参数设置为：蛋白 FDR 为 1%，多肽 FDR 为 1%，每个蛋白至少包含 2 条特异性多肽，总谱图数标准化，根据标准化后的二级谱图数进行后续分析。

2.5 统计分析

每个样品采用三次技术重复的数值用于统计学分析，每位患者采用治疗前的尿液样本所鉴定到的尿蛋白作为自身对照，与治疗后的尿液样本所鉴定到的尿蛋白进行对比。筛选每个治疗时间点的差异蛋白条件如下：变化倍数≥1.5 或≤0.67，双尾配对 t 检验 P 值＜0.05。所用软件为 Graphpad Prism（版本 7.0，Graphpad 公司）。

2.6 差异蛋白的功能注释

使用 DAVID 数据库分析了在不同时间点鉴定到的差异蛋白，根据生物学过程对蛋白质进行了分析。

3.结果和讨论

3.1 肺癌患者尿蛋白质组的变化

自 2018 年 10 月至 2019 年 6 月，本研究共收集了 8 位患者用药前后的不同时间点尿液样本，共计 23 个样本进行分析。尿液样本收集时间、用药情况和临床表现详见表 3 至表 10。每个样本取 1ug 肽段样品，采用数据非依赖采集模式进行质谱分析。在 8 位患者中，鉴定到的尿蛋白数量如表 2。筛选条件为：变化倍数值≥1.5 或≤0.67，*P* 值＜0.05。

表 2　8 位患者鉴定到的尿蛋白情况。

患者编号	鉴定尿蛋白总数	不同时间点鉴定到的差异蛋白数和其占总差异蛋白数中的百分比		
		T1	T2	T3
P1	1448	262，55.5%	223，47.2%	241，51.1%
P2	1534	161，32.8%	302，61.5%	232，47.2%
P3	1049	71，100%	—	—
P4	1107	315，100%	—	—
P5	1178	233，100%	—	—
P6	1838	276，32.5%	330，38.8%	628，73.9%
P7	1215	212，100%	—	—
P8	1248	194，47.5%	329，80.6%	—

—：代表该患者无该时间点的尿蛋白样本。T1，2，3：代表不同的尿液样本采集时间。

3.2 P1 患者的蛋白质组功能分析

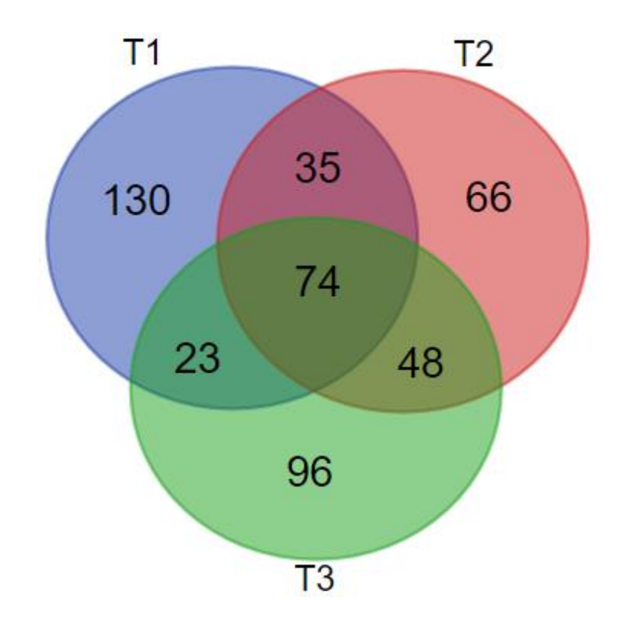
一共收集了 P1 患者用药前后四个时间点的尿液样本进行质谱分析，尿液样本的详细信息和患者的临床症状见表 3。与用药前的蛋白质组的结果相比，一共鉴定到了 1448 种蛋白，经过筛选后共鉴定到 472 个差异蛋白，其中在 T1、T2 和 T3 三个时间点分别鉴定到了 262、223 和 241 个差异蛋白（表 2）。Venn 图显示了三个时间点的差异蛋白重叠情况（图 1A）。在 T1 时间点，分别有 175 种上调和 87 种下调的差异蛋白；在第 T2 时间点，分别有 142 种上调和 81 种下调的差异蛋白；在 T3 时间点，分别有 140 种上调和 101 种下调的差异蛋白。共有 74 个蛋白在三个时间点发生了连续的变化，T1、T2 和 T3 三个时间点独有的差异蛋白数量分别为 130、66 和 96 种。

本实验为单盲实验，即在分析尿蛋白引起的生物学变化结果时，所有患者的病情评估和用药情况未知。对 T1、T2 和 T3 三个时间点鉴定到的差异蛋白分别采用 DAVID 数据库进行功能富集分析。生物学过程方面显示在三个时间点，一些与免疫相关和肿瘤生长有关的生物学过程发生了变化（表 3，图 1B）。在用药阶段的第一个时间点 T1，补体激活、细胞对生长因子刺激的反应、补体激活和经典途径、细胞对肿瘤坏死因子的反应、调节免疫反应、先天免疫反应、抗原加工和呈递、Fc-ε 受体信号通路、参与吞噬作用的 Fc-γ 受体信号通路和慢性炎症反应等生物学过程发生了显著变化。与用药前相比，此时患者体内的免疫相关反应变化较为显著，表明免疫系统活化。在用药阶段的第二个时间点 T2，补体激活、补体激活及经典途径、参与吞噬作用的 Fc-γ 受体信号通路、免疫反应和补体激活及替代途径等生物学过程发生了变化，且这些免疫相关反应在整体的生物学过程中变化显著，表明免疫系统活化后，持续的大量识别或杀伤肿瘤细胞，与此时患者病情评估为缩小的情况相符合；在用药阶段的第三个时间点 T3，补体激活、补体激活及经典途径、免疫反应、补体激活及替代途径、补体激活的调节、炎症反应和糖异生等生物学过程发生了变化，糖异生被报道与肿瘤的生长相关[25]，此时患者病情评估为稳定。

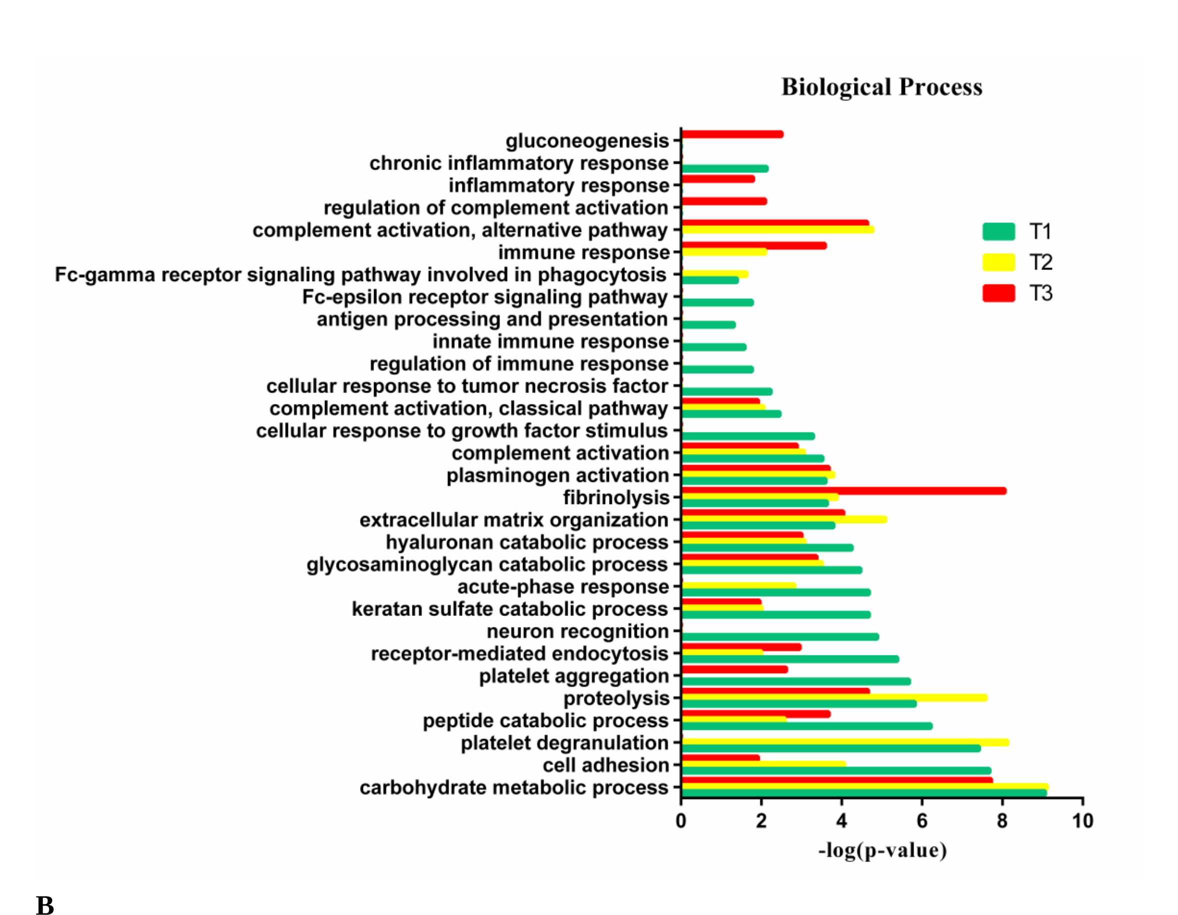
上述这些生物学过程变化的结果表明，尿蛋白反映的变化与临床表现相符，使用培美曲塞、顺铂和贝伐单抗的联合治疗对该患者的病情有较好的治疗效果。

表 3 患者 P1 的尿液样本收集情况和不同时间点变化的生物学过程。

尿液收集时间	临床表现	用药时间	用药情况	变化显著的生物学过程（部分）
CON (2018.11.25)	化疗前，无特殊	无	无	无
T1 (2019.01.08)	无特殊，病情评估稳定	无	无	T1: 碳水化合物代谢过程、细胞粘附、血小板脱粒、肽分解代谢过程、蛋白水解、血小板聚集、受体介导的内吞作用、神经元识别、硫酸角质素分解代谢过程、急性期反应、糖胺聚糖分解代谢过程、透明质酸分解代谢过程、细胞外基质组织、纤维蛋白溶解纤溶酶原激活、补体激活、细胞对生长因子刺激的反应、补体激活，经典途径、细胞对肿瘤坏死因子的反应、调节免疫反应、先天免疫反应、抗原加工和呈递、Fc-ε 受体信号通路、参与吞噬作用的 Fc-γ 受体信号通路
T2 (2019.02.21)	无特殊，病情评估缩小	2019.01.23	培美曲塞：930mg（第一天）；顺铂：40mg（第一到第三天）；贝伐单抗：500mg（第一天）	T2: 碳水化合物代谢过程、细胞粘附、血小板脱粒、肽分解代谢过程、蛋白水解、受体介导的内吞作用、硫酸角质素分解代谢过程、急性期反应、糖胺聚糖分解代谢过程、透明质酸分解代谢过程、细胞外基质组织、纤维蛋白溶解纤溶酶原激活、补体激活、补体激活，经典途径、参与吞噬作用的 Fc-γ 受体信号通路、免疫反应、补体激活，替代途径
T3 (2019.04.10)	无特殊，病情评估稳定	2019.04.09	培美曲塞：930mg（第一天）；贝伐单抗：500mg（第一天）	T3: 碳水化合物代谢过程、细胞粘附、肽分解代谢过程、蛋白水解、血小板聚集、受体介导的内吞作用、硫酸角质素分解代谢过程、糖胺聚糖分解代谢过程、透明质酸分解代谢过程、细胞外基质组织、纤维蛋白溶解纤溶酶原激活、补体激活、细胞对生长因子刺激的反应、补体激活，经典途径、免疫反应、补体激活，替代途径、补体激活的调节、炎症反应、糖异生



A



B

图 1 患者 P1 的蛋白变化情况和功能分析。A）T1、T2 和 T3 三个时间点差异蛋白的韦恩图。B）T1、T2 和 T3 三个时间点的差异蛋白的生物过程。

3.3 P2 患者的蛋白质组分析

P2 患者一共收集了用药前后四个时间点的尿液样本进行质谱分析，尿液样本的详细信息和患者的临床症状见表 4。与用药前的蛋白质组的结果相比，一共

鉴定到了 1534 种蛋白，经过筛选后共鉴定到 491 个差异蛋白，其中在 T1、T2 和 T3 三个时间点分别鉴定到了 161、302 和 232 个差异蛋白（表 2）。在 T1 时间点，分别有 78 种上调和 83 种下调的差异蛋白；在第 T2 时间点，分别有 110 种上调和 192 种下调的差异蛋白；在 T3 时间点，分别有 93 种上调和 139 种下调的差异蛋白。Venn 图显示了不同时间点的差异蛋白重叠情况（图 2A），共有 27 个蛋白在三个时间点发生了连续的变化，T1、T2 和 T3 三个时间点独有的差异蛋白数量分别为 79、146 和 89 种。

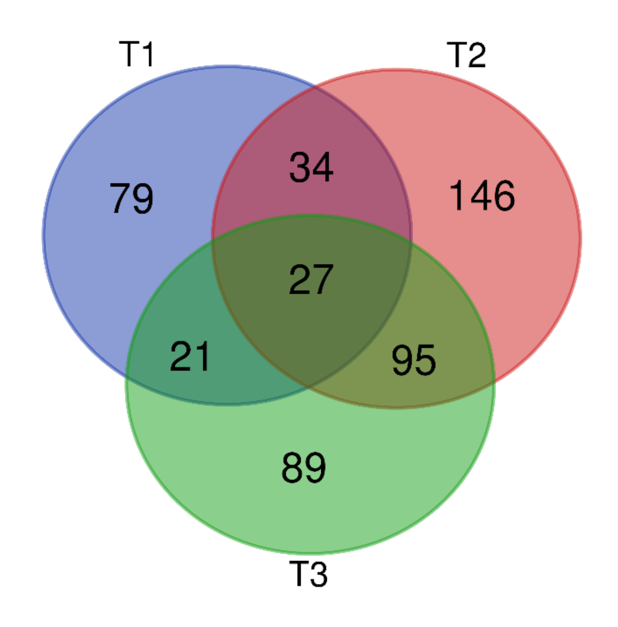
对 T1、T2 和 T3 三个时间点鉴定到的差异蛋白分别采用 DAVID 数据库进行功能富集分析。生物学过程方面的变化如表 4、图 2B 所示。在第一次用药后的时间点 T1，蛋白水解、细胞蛋白质代谢过程、蛋氨酸的生物合成过程、果糖代谢过程、糖异生、中性粒细胞聚集、丝氨酸家族氨基酸的生物合成过程和炎症反应的正调控等生物学过程变化显著，其中蛋白水解在三个时间点连续变化显著。与用药前相比，此时患者体内的被鉴定到的变化显著的免疫反应数量较少，而与肿瘤生长相关的生物学过程变化较为显著，此时患者病情评估为稳定。据报道在这些变化的生物学过程中，（1）中性粒细胞聚集与许多过程有关，包括急性损伤和修复，慢性炎症过程，癌症和自身免疫等[26]；（2）蛋氨酸的生物合成与肿瘤相关，许多癌细胞类型都需要外源蛋氨酸才能生存[27]，癌细胞对蛋氨酸的异常依赖性导致蛋氨酸限制作为一种潜在的治疗策略[28]；（3）丝氨酸作为叶酸循环的重要一碳供体，能够起到抗氧化作用，许多癌细胞高度依赖丝氨酸[29]。在之后用药阶段的时间点 T2 和 T3，共同变化的生物学过程有血小板脱粒、细胞粘附、碳水化合物代谢过程、蛋白水解参与细胞蛋白分解代谢过程、参与吞噬作用的 Fc-γ 受体信号通路、Fc-ε 受体信号通路、肿瘤坏死因子介导的信号通路、Wnt 信号传导途径和平面细胞极性途径、调节免疫系统过程、血管生成的负调控、细胞识别、细胞间粘附、补体激活、补体激活经典途径、L-蛋氨酸的抢救等。除以上共同变化的生物学过程之外，在 T2 时间点变化的生物学过程还包括 NIK / NF-kappaB 信号传导、调节免疫反应、Wnt 信号通路的正调控、糖酵解过程和炎症反应的调节等，在 T3 时间点变化的包括受体介导的内吞作用、急性炎症反应、白细胞迁移、免疫反应等。一些过程被报道与肿瘤有一定相关性，例如：（1）肿瘤细胞通常表现出细胞间和/或细胞基质粘附的减少，越来越多的证据表明，细胞粘附的减少与肿瘤的侵袭和转移有关[30]；（2）NF-κB 在体内具有抗炎作用[31]；（3）Wnt 信号异常通常被认为是通过影响癌症干细胞（CSC）的行为引发和/或维持和发展许多癌症的关键因素[32]；（4）血管生成被认为是肿瘤发生的共同特征[33]。

上述这些与肿瘤生长负相关的生物学过程出现变化，可能与患者使用化疗药物治疗有关；而大量免疫相关的生物学过程在这两个时间点增多，可能与使用信迪利单抗治疗有关，此时免疫系统被活化。但是在整体的生物学过程变化中上述这些变化显著程度较低，免疫相关变化出现时间较晚，可能这些药物的联用在患者体内并没有控制好肿瘤，此时这两个时间点患者的病情评估为进展。

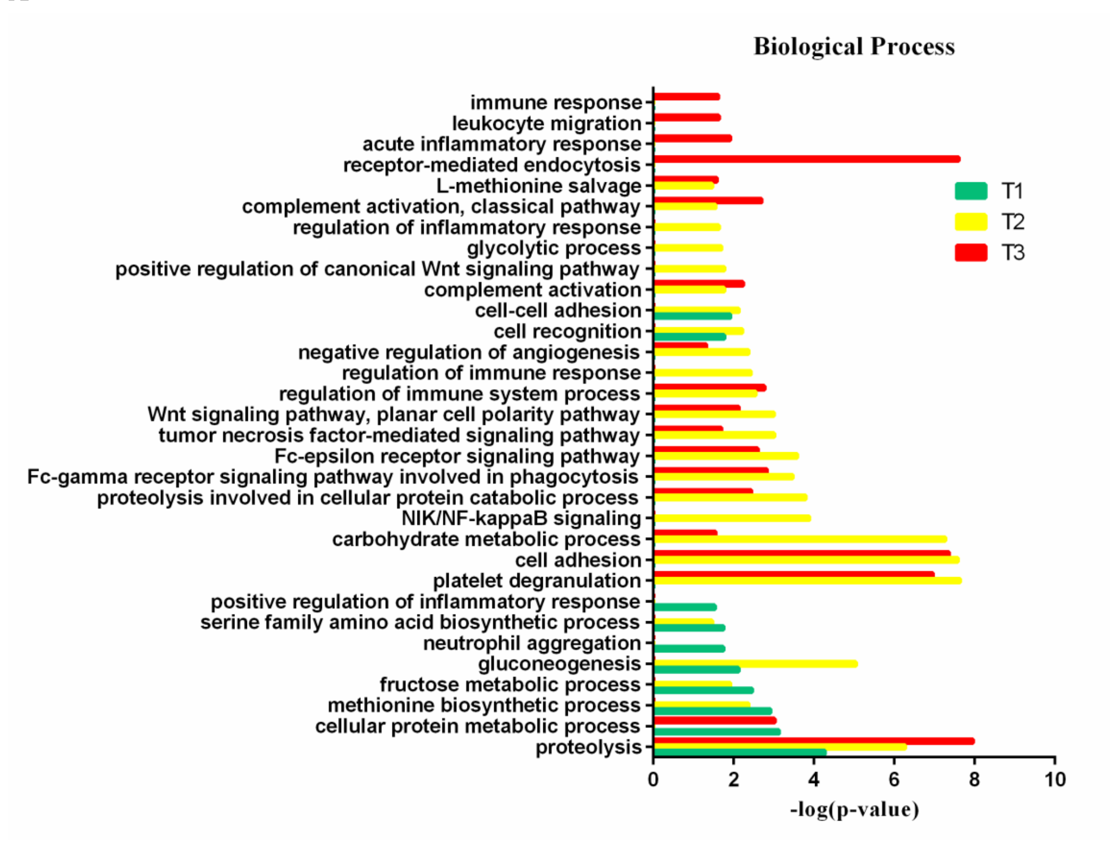
表 4 患者 P2 的尿液样本收集情况和不同时间点变化的生物学过程。

尿液收集时间	靶病灶长度	非靶病灶	总体疗效评估	临床表现	用药时间	用药情况	变化显著的生物学过程（部分）
CON (2018.12.11)	35.2	存在	基线期	化疗前，体重自术后 3 个月下降 5kg	无	无	无
T1 (2019.01.23)	36.4	存在	SD	无特殊，病情评估稳定	2019.01.08	信迪利单抗：200mg（第一天）；培美曲塞：991mg（第一天）；顺铂：149mg（第一天）	T1: 蛋白水解、细胞蛋白质代谢过程、蛋氨酸的生物合成过程、果糖代谢过程、糖异生、中性粒细胞聚集、丝氨酸家族氨基酸的生物合成过程和炎症反应的正调控、细胞识别、细胞间粘附
T2 (2019.04.29)	—	—	—	无特殊，病情评估进展，腹部包块增大	2019.02.21	信迪利单抗：200mg（第一天）；培美曲塞：991mg（第一天）；顺铂：149mg（第一天	T2: 血小板脱粒、细胞粘附、碳水化合物代谢过程、蛋白水解\糖异生、NIK / NF-kappaB 信号传导、蛋白水解参与细胞蛋白分解代谢过程、Fc-ε 受体信号通路、参与吞噬作用的 Fc-γ 受体信号通路、肿瘤坏死因子介导的信号通路、Wnt 信号传导途径，平面细胞极性途径、调节免疫系统过程、调节免疫反应、蛋氨酸的生物合成过程、血管生成的负调控
					2019.03.29	信迪利单抗：200mg（第一天）；培美曲塞：991mg（第一天）	细胞识别、细胞间粘附、果糖代谢过程、补体激活、Wnt 信号通路的正调控、糖酵解过程、炎症反应的调节、补体激活，经典途径、丝氨酸家族氨基酸的生物合成过程、L-蛋氨酸的抢救
T3 (2019.06.04)	94.3	存在	PD	无特殊，病情评估进展，腹部包块快速增大	2019.06.04	信迪利单抗：200mg（第一天）；培美曲塞 991mg（第一天）	T3: 蛋白水解、受体介导的内吞作用、细胞粘附、血小板脱粒、细胞蛋白质代谢过程、参与吞噬作用的 Fc-γ 受体信号通路、调节免疫系统过程、补体激活和经典途径、Fc-ε 受体信号通路、蛋白水解参与细胞蛋白分解代谢过程、补体激活、Wnt 信号传导途径和平面细胞极性途径、急性炎症反应、肿瘤坏死因子介导的信号通路、白细胞迁移、免疫反应、L-蛋氨酸的抢救、碳水化合物代谢过程、血管生成的负调控

—：代表缺失该部分信息； PD: Progressive Disease，代表疾病进展; SD: Stable Disease，代表疾病稳定。



A



B

图 2 患者 P2 的蛋白变化情况和功能分析。A）T1、T2 和 T3 三个时间点差异蛋白的韦恩图。B）T1、T2 和 T3 三个时间点的差异蛋白的生物过程。

3.4 P3 样本的蛋白质组分析

P3 患者共收集了用药前后两个时间点的尿液样本进行质谱分析，尿液样本的详细信息和患者的临床症状见表 5。与用药前的蛋白质组的结果相比，一共鉴定到了 1049 种蛋白，经过筛选后共鉴定到 71 个差异蛋白（表 2)。治疗后变化

的差异蛋白中，分别有 39 种上调和 32 种下调的差异蛋白。

对鉴定到的差异蛋白采用 DAVID 数据库进行功能富集分析。生物学过程方面的变化显示如表 5 和图 3。其中，血小板脱粒、血小板聚集、血液凝固及纤维蛋白凝块形成、凝血、伤口愈合及细胞扩散等生物学过程变化明显，这可能和患者自身在治疗前出现就咳嗽、咳血等症状有关，治疗后其咳血症状缓解。免疫相关反应方面的变化主要包括有 NF-κB 转录因子活性的正调控、炎症反应的正调控、中性粒细胞聚集、白细胞迁移参与炎症反应等。其他生物学过程的变化可能和肿瘤相关，如细胞粘附、一氧化氮生物合成过程的正调控，据报道一氧化氮对肿瘤具有不同的作用，因为它可以刺激肿瘤细胞的生长或促进其死亡（取决于其来源）[34]。

在该患者的生物学过程并没有鉴定到之前病情进展的患者体内出现的糖酵解、糖异生等肿瘤生长活动旺盛的生物学过程，表明使用帕姆单抗治疗该患者后有一定疗效，这与患者病情评估为稳定相符合，可能该药物的疗效还需要后续观察。

表 5 患者 P3 的尿液样本收集情况和变化的生物学过程。

尿液收集时间	临床表现	用药时间	用药情况	变化显著的生物学过程（部分）
CON (2018.12.25)	化疗前，病情复发，主要症状为咳嗽、咳血	无	无	无
T1 (2019.02.22)	病情评估稳定，咳血缓解	2019.02.02	帕姆单抗：200mg（第一天）	T1: NF-κB 转录因子活性的正调控、炎症反应的正调控、中性粒细胞聚集、血小板脱粒、血小板聚集、一氧化氮生物合成过程的正调控、血液凝结和纤维蛋白凝块形成、细胞粘附、凝血、白细胞迁移参与炎症反应、伤口愈合及细胞扩散

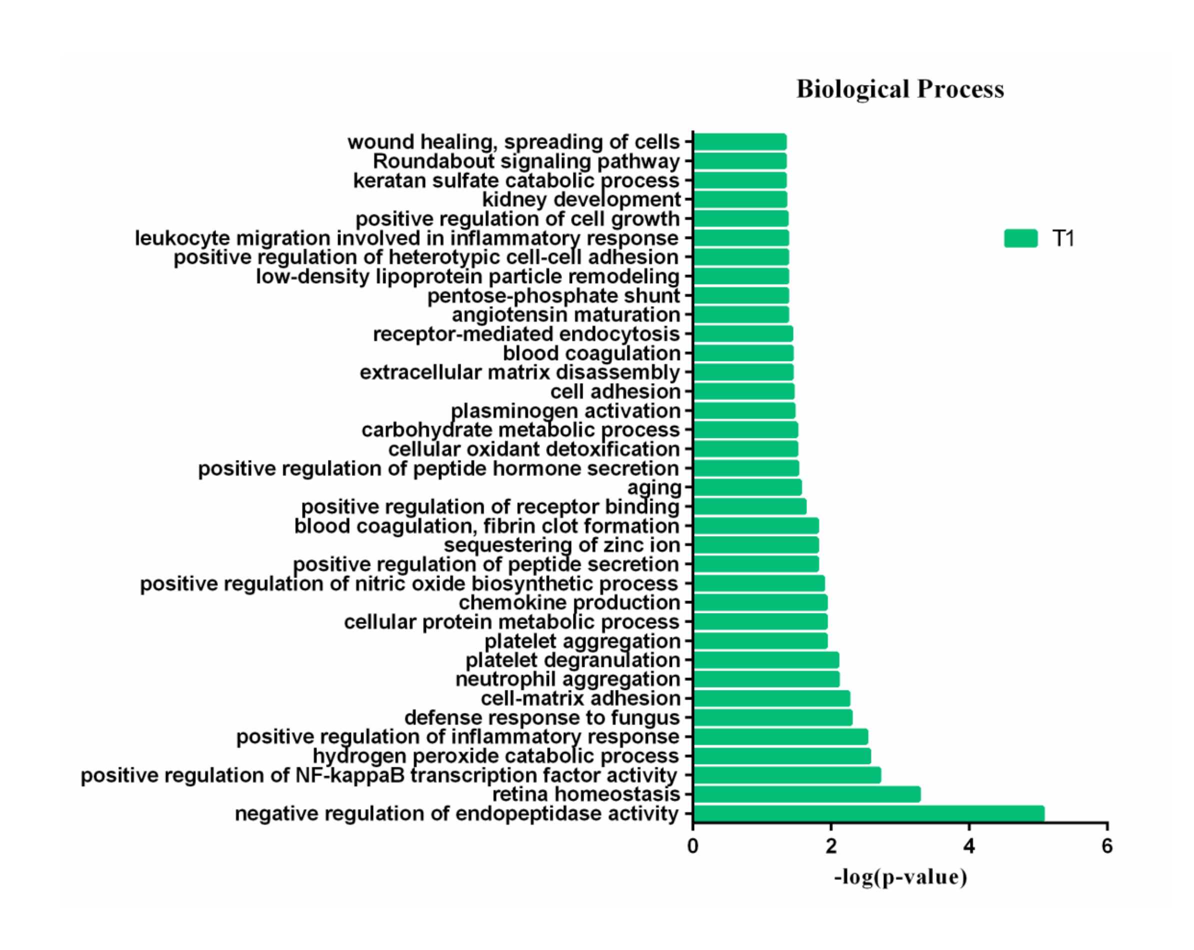


图 3 患者 P3 的差异蛋白功能分析。

3.5 P4 患者的蛋白质组分析

P4 患者共收集了用药前后两个时间点的尿液样本进行质谱分析，尿液样本的详细信息和患者的临床症状见表 6。与用药前的蛋白质组的结果相比，一共鉴定到了 1107 种蛋白，经过筛选后共鉴定到 315 个差异蛋白（表 2）。治疗后变化的差异蛋白中，分别有 134 种上调和 181 种下调的差异蛋白。

对鉴定到的差异蛋白采用 DAVID 数据库进行功能富集分析。生物学过程方面的变化显示如表 6 和图 4。与同样只有一个时间点的 P3 患者相比，P4 患者的差异蛋白数量较多，变化的生物学过程数量更多。这表明同样使用相同的药物帕姆单抗治疗，该患者受药物影响更大。其中，变化显著程度较高的生物学过程中，包括了大量的免疫反应过程，如补体激活及经典途径、急性期反应、补体激活、补体激活的调节、补体激活及替代途径、先天免疫反应和调节免疫系统过程等生物学过程，表面此时使用帕姆单抗治疗后，患者体内的免疫系统被激活，免疫反应带来的影响在整体的生物学过程的变化中占重要的地位。此外，一些生物学过程也被报道与肿瘤相关，除了上文患者结果中描述的细胞粘附、血小板脱粒和蛋白水解等生物学过程，还包括：（1）类维生素 A 代谢过程也发挥重要作用，由于类维生素 A 及其合成衍生物具有调节细胞生长、诱导细胞分化和凋亡的能力，已经成为公认的抗癌治疗方法 [35]；（2）纤维蛋白的溶解，纤维蛋白通过提供用于肿瘤细胞迁移的基质以及通过与粘附分子和整联蛋白的相互作用来促进细胞迁移，纤溶成分对肿瘤产生不同的作用，包括促进肿瘤细胞粘附于 ECM、促进细胞增殖、增加肿瘤细胞存活率等等 [36]。另一方面，与肿瘤生长正相关的生物学过

程变化显著程度较低，尽管其总体变化的生物学过程比 P3 患者多，但被鉴定到的与肿瘤生长正相关的生物学过程没有明显增多，这表明差异蛋白的变化更多受免疫反应的影响。

上述变化的生物学过程结果表明，尿蛋白反映的变化与临床表现相符，使用帕姆单抗对该患者疗效较好。

表 6 患者 P4 的尿液样本收集情况和变化的生物学过程。

尿液收集时间	临床表现	用药时间	用药情况	变化显著的生物学过程（部分）
CON (2019.01.04)	化疗前，主要症状为咳嗽	无	无	无
T1 (2019.06.28)	病情评估缩小，无特殊（化疗药物减少顺铂）	2019.06.17	帕姆单抗:200mg（第一天）	T1: 细胞粘附、血小板脱粒、蛋白水解、补体激活及经典途径、急性期反应、补体激活、补体激活的调节、补体激活及替代途径、类维生素 A 代谢过程、碳水化合物代谢过程、纤维蛋白溶解、先天免疫反应和调节免疫系统过程、白细胞与细胞的粘附、炎症反应、免疫反应、吞噬作用和识别、调节免疫反应、葡萄糖代谢过程、参与吞噬作用的 Fc-γ 受体信号通路

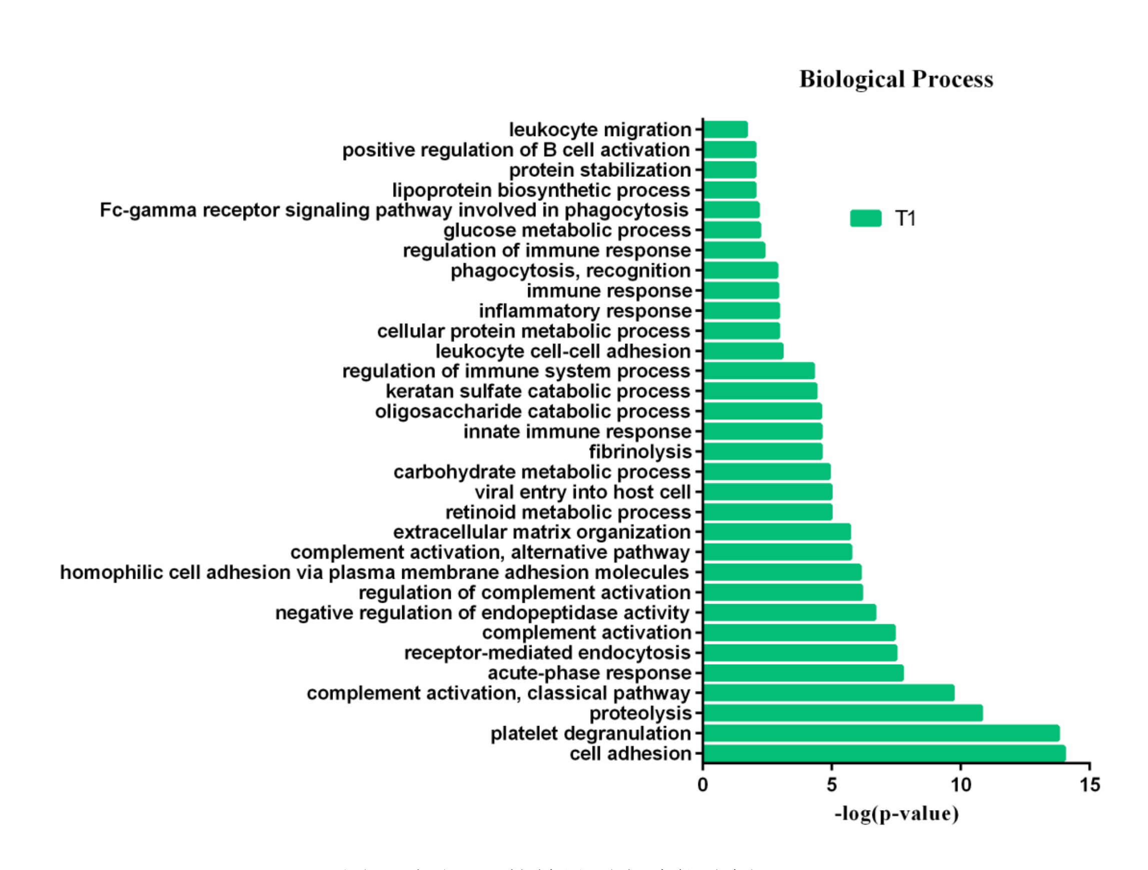


图 4 患者 P4 的差异蛋白功能分析。

3.6 P5 患者的蛋白质组分析

P5 患者共收集了用药前后两个时间点的尿液样本进行质谱分析，尿液样本的详细信息和患者的临床症状见表 7。与用药前的蛋白质组的结果相比，一共鉴定到了 1178 种蛋白，经过筛选后共鉴定到 233 个差异蛋白（表 2）。治疗后变化的差异蛋白中，分别有 91 种上调和 142 种下调的差异蛋白。

对鉴定到的差异蛋白采用 DAVID 数据库进行功能富集分析。生物学过程方面的变化显示如表 7 和图 5。同 P4 患者一样，P5 患者的差异蛋白数量较多。在变化程度较为显著的生物学过程中，出现了大量的分解代谢过程，包括硫酸软骨素分解代谢过程、碳水化合物代谢过程、蛋白水解、糖鞘脂代谢过程、糖胺聚糖分解代谢过程、类维生素 A 代谢过程、寡糖分解代谢过程、纤维蛋白溶解、细胞蛋白质代谢过程、糖胺聚糖代谢过程，这些过程可能与肿瘤相关。尽管变化的生物学过程较多，但与免疫反应相关的生物学过程较少，出现变化的免疫相关过程如急性期反应、补体激活及替代途径、补体激活的调节和先天免疫反应等，变化的显著程度较低，这可能与该患者未使用免疫药物治疗有关。

根据上述生物学过程的变化，推断该患者使用的依托泊苷加顺铂联合治疗有一定疗效，此时患者病情评估为稳定，可能该药疗效还需要后续观察。

表 7 患者 P5 的尿液样本收集情况和变化的生物学过程。

尿液收集时间	临床表现	用药时间	用药情况	变化显著的生物学过程（部分）
CON (2018.12.21)	无	无	无	无
T1 (2019.03.19)	病情评估稳定	2019.02.19	依托泊苷:170mg (第一到第三天)；顺铂：50mg（第一天），40mg（第二到第三天）	T1: 内肽酶活性的负调控、细胞粘附、硫酸软骨素分解代谢过程、碳水化合物代谢过程、血小板脱粒、细胞外基质组织、蛋白水解、糖鞘脂代谢过程、糖胺聚糖分解代谢过程、通过质膜粘附分子粘附同质细胞、类维生素 A 代谢过程、寡糖分解代谢过程、纤维蛋白溶解、细胞蛋白质代谢过程、粘附连接组织、上皮细胞分化、糖胺聚糖代谢过程

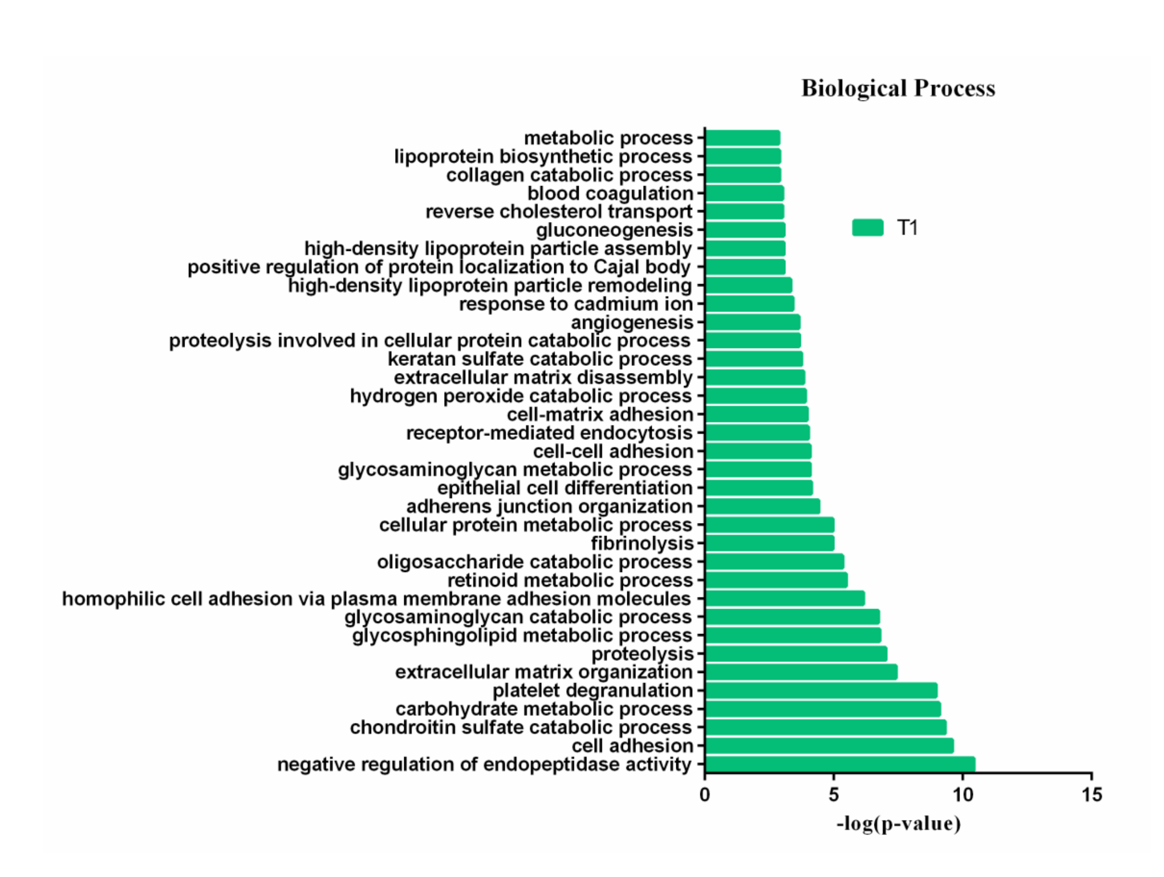


图 5 患者 P5 的差异蛋白功能分析。

3.7 P6 样本的蛋白质组分析

P6 患者共收集了用药前后四个时间点的尿液样本进行质谱分析，尿液样本的详细信息和患者的临床症状见表 8。与用药前的蛋白质组的结果相比，一共鉴定到了 850 个差异蛋白，其中在 T1、T2 和 T3 三个时间点分别鉴定到了 276、330 和 628 个差异蛋白（表 2）。在 T1 时间点，分别有 163 种上调和 113 种下调的差异蛋白；在第 T2 时间点，分别有 246 种上调和 84 种下调的差异蛋白；在 T3 时间点，分别有 442 种上调和 186 种下调的差异蛋白。Venn 图显示了不同时间点的差异蛋白重叠情况（图 6A），共有 86 个蛋白在三个时间点发生了连续的变化，T1、T2 和 T3 三个时间点独有的差异蛋白数量分别为 84、109 和 359 种。

对 T1、T2 和 T3 三个时间点鉴定到的差异蛋白分别采用 DAVID 数据库进行功能富集分析。生物学过程方面的变化显示在三个时间点，一些共有的生物学过程发生了变化（表 8、图 6B），包括血小板脱粒、补体激活的调节、补体激活及替代途径、蛋白水解、内肽酶活性的负调控、补体激活、细胞粘附、糖胺聚糖分解代谢过程、凝血、补体激活，经典途径、细胞粘附的负调控、细胞氨基酸代谢过程、急性期反应、白细胞迁移、细胞间粘附、代谢过程、碳水化合物代谢过程和氧化还原过程等生物学过程。这些生物学过程包含了一些与免疫反应和肿瘤生长相关的反应。除了和上文其他患者相同的被报道过的生物学过程之外，一些生物学过程的变化也与肿瘤相关，例如：（1）肿瘤会重新编程养分获取和代谢途径，从而满足生物能、生物合成和恶性细胞的氧化还原需求 [37]；（2）一些代谢特征在许多类型的癌细胞中出现改变，因此变化的新陈代谢通常被认为是癌症的标志 [38,39]。在用药阶段的第一个时间点 T1，补体激活的调节、补体激活及替代途径、补体激活、调节免疫反应、补体激活及经典途径等免疫相关生物学过程变化较为

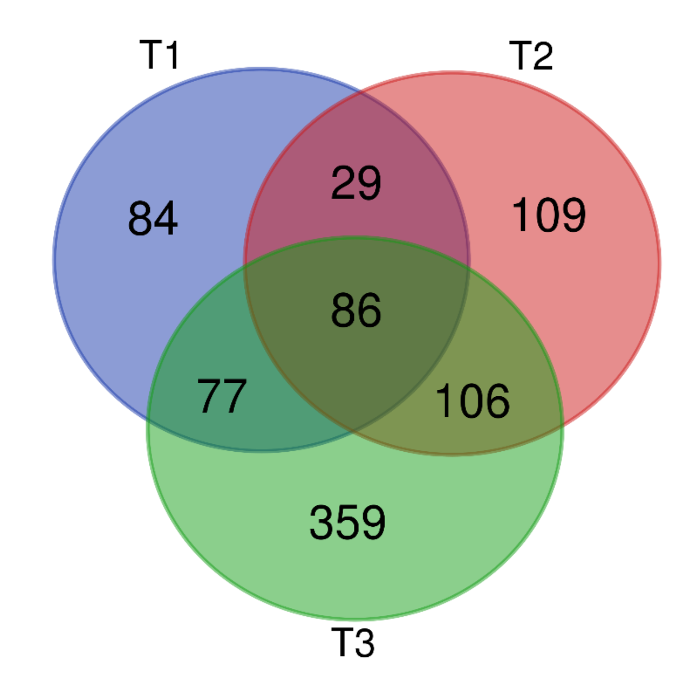
显著，表明患者体内的免疫系统被激活，此时间点的患者病情评估稳定。在用药阶段的第二个时间点 T2，随着患者免疫系统的活化，补体激活的调节和白细胞迁移、补体激活及替代途径、肿瘤坏死因子介导的信号通路等生物学过程变化显著，同时肿瘤生长相关的生物学过程糖酵解和糖异生等变化过程也被鉴定到，此时患者病情评估稳定。在用药阶段的第三个时间点 T3，差异蛋白数量与两个时间点比较明显增多，代谢分解过程、糖酵解和糖异生变化显著，免疫反应相关过程持续被鉴定到。

三个时间点的生物学过程变化结果表明，在整体治疗过程中，免疫相关生物学过程变化较为显著，是尿蛋白反映的变化与临床病情评估缩小的趋势相符，表明使用药物培美曲塞加顺铂的联合治疗对患者有较好疗效。

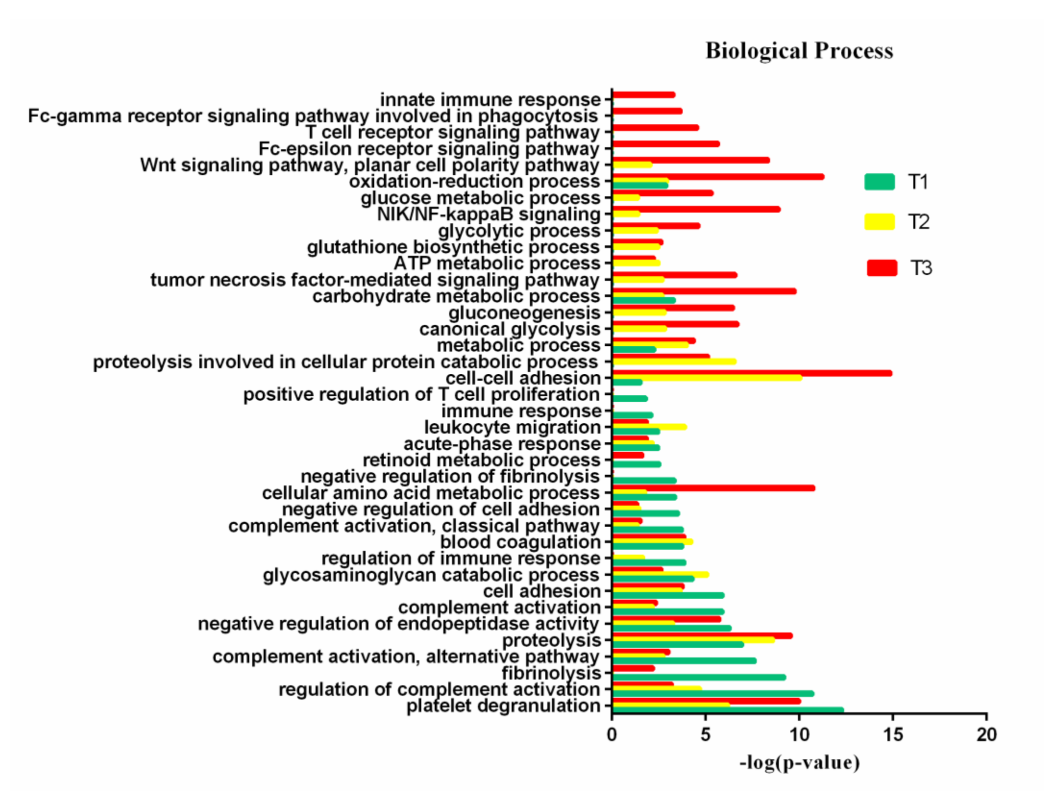
表 8 患者 P6 的尿液样本收集情况和不同时间点变化的生物学过程。

尿液收集时间	靶病灶长度	非靶病灶	总体疗效评估	临床表现	用药时间	用药情况	变化显著的生物学过程（部分）
CON (2018.10.28)	66.6	存在	基线期	未治疗，主要症状为重咳嗽	无	无	无
T1 (2018.12.12)	60.7	存在	SD	病情评估稳定，主要症状为 CT 新见右肺新发斑片影，面部皮疹增多	2018.11.22	培美曲塞：881 毫克（第一天）；顺铂：132 毫克（第一天）	T1：血小板脱粒、补体激活的调节、纤维蛋白溶解、补体激活和替代途径、蛋白水解、内肽酶活性的负调控、补体激活、细胞粘附、糖胺聚糖分解代谢过程、调节免疫反应、凝血、补体激活和经典途径、细胞粘附的负调控、细胞氨基酸代谢过程、纤维蛋白溶解的负调节、碳水化合物代谢过程、氧化还原过程、类维生素 A 代谢过程、急性期反应、白细胞迁移、代谢过程、免疫反应、T 细胞增殖的正调控、细胞间粘附
T2 (2019.01.25)	54.6	存在	SD	病情评估稳定，主要症状为近期反酸烧心严重	2019.01.04	培美曲塞：881 毫克（第一天）；顺铂：132 毫克（第一天）	T2：细胞间粘附、蛋白水解、蛋白水解参与细胞蛋白分解代谢过程、血小板脱粒、糖胺聚糖分解代谢过程、补体激活的调节、凝血、代谢过程、白细胞迁移、细胞粘附、内肽酶活性的负调控、氧化还原过程、常规糖酵解、糖异生、补体激活和替代途径、碳水化合物代谢过程、肿瘤坏死因子介导的信号通路、ATP 代谢过程、谷胱甘肽的生物合成过程、糖酵解过程、补体激活、急性期反应、Wnt 信号传导途径，平面细胞极性途径、细胞氨基酸代谢过程、调节免疫反应、细胞粘附的负调控、NIK / NF-kappaB 信号传导、葡萄糖代谢过程、补体激活，经典途径

SD: Stable Disease，代表疾病稳定。



A



B

图 6 患者 P6 的蛋白变化情况和功能分析。A）T1、T2 和 T3 三个时间点差异蛋白的韦恩图。B）T1、T2 和 T3 三个时间点的差异蛋白的生物过程。

3.8 P7 样本的蛋白质组分析

P7 患者共收集了用药前后两个时间点的尿液样本进行质谱分析，尿液样本的详细信息和患者的临床症状见表 9。与用药前的蛋白质组的结果相比，一共鉴

定到了 1215 种蛋白，经过筛选后共鉴定到 212 个差异蛋白（表 2）。治疗后变化的差异蛋白中，分别有 86 种上调和 126 种下调的差异蛋白。

对鉴定到的差异蛋白采用 DAVID 数据库进行功能富集分析。生物学过程方面的变化显示如表 9 和图 7。与其它患者不同的是，该患者在接受首次治疗后出现严重的发烧、肺炎等症状，导致其死亡。患者的肺炎可能是由于使用信迪利单抗治疗后引起的不良副反应。这是由于信迪利单抗是一种人类免疫球蛋白 G4 单克隆抗体，能特异性结合 T 细胞表面的 PD-1 分子，从而激活淋巴细胞达到治疗肿瘤的目的。但在治疗的同时也可能引发多种自身免疫性副作用，称为免疫相关不良反应（termed immune-related adverse events，irAEs），如免疫相关性肺炎、心肌炎、肾炎及肾功能不全、肝炎等 [40]。有报道称在此类药物治疗的临床试验中，出现过 3 例致死性肺炎 [41]。在该患者变化的尿蛋白反映的整体生物学过程中，血小板脱粒、糖异生、白细胞迁移、类维生素 A 代谢过程、细胞粘附、细胞或亚细胞成分的运动、内肽酶活性的负调控、细胞外基质组织、细胞对肿瘤坏死因子的反应、糖胺聚糖分解代谢过程等生物学过程变化最为显著。

该患者在使用信迪利单抗、培美曲塞和卡铂治疗一段时间后出现了严重的不良反应，但在其出现症状后开始收集的尿液样本中，并没有在其生物学过程中观察到大量的免疫和细胞因子相关生物学过程发生显著变化，推测原因可能是由于免疫不良反应出现的过程非常突然和快速，在此之前的体内的生物学过程仍处于相对正常状态，患者的尿蛋白质组并没有受到影响。

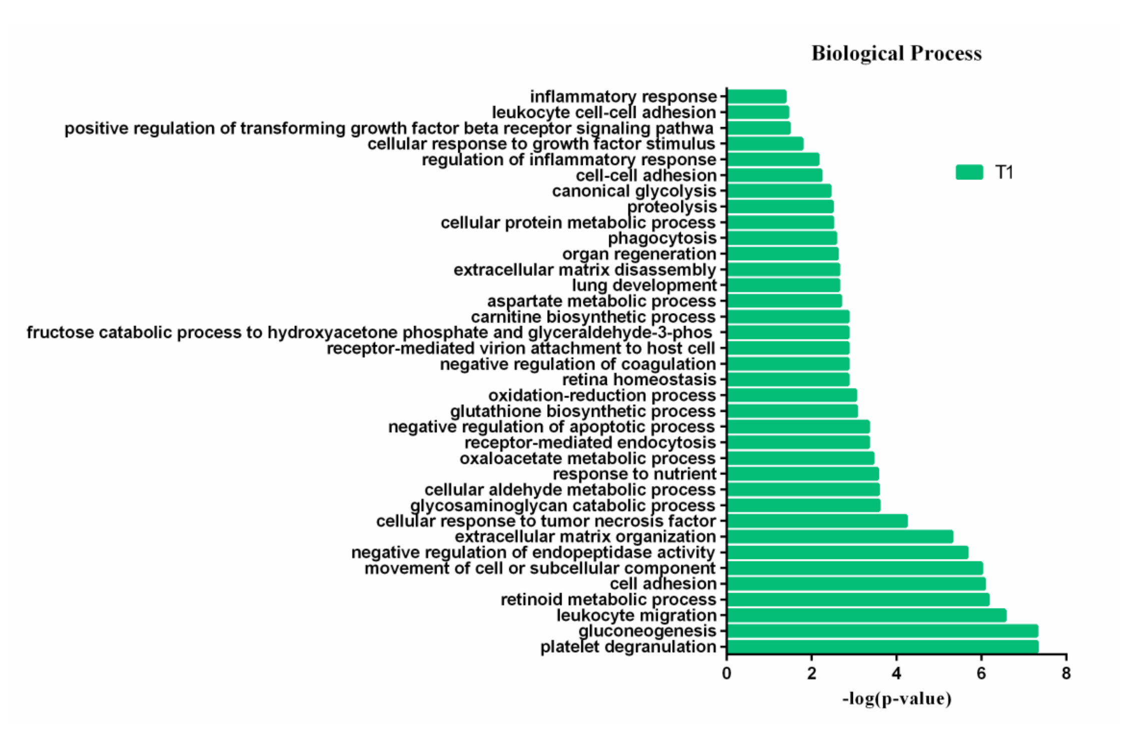


图 7 患者 P7 的差异蛋白功能分析。

表 9 患者 P7 的尿液样本收集情况和变化的生物学过程。

尿液收集时间	靶病灶长度	非靶病灶	总体疗效评估	临床表现	用药时间	用药情况	变化显著的生物学过程（部分）
CON (2018.11.20)	15.2	存在	基线期	无	无	无	无
T1 (2018.12.11)	—	—	—	2018.12.07 出现发烧，肺炎；随后死亡	2018.11.20	培美曲塞：866 毫克，卡铂：629 毫克，信迪利单抗：200 毫克	T1: 血小板脱粒、糖异生、白细胞迁移、类维生素 A 代谢过程、细胞粘附、细胞或亚细胞成分的运动、内肽酶活性的负调控、细胞外基质组织、细胞对肿瘤坏死因子的反应、糖胺聚糖分解代谢过程、细胞醛代谢过程、对营养的反应、草酰乙酸代谢过程、受体介导的内吞作用、凋亡过程的负调控、谷胱甘肽的生物合成过程、氧化还原过程、视网膜稳态、凝血的负调节、受体介导的病毒体附着于宿主细胞、果糖分解代谢工艺制备磷酸羟丙酮和 3-磷酸甘油醛、肉碱的生物合成过程、天冬氨酸代谢过程、肺发育、细胞外基质拆卸、器官再生、吞噬作用、细胞蛋白质代谢过程、蛋白水解、常规糖酵解

—：代表缺失该部分信息。

3.9 P8 样本的蛋白质组分析

P8 患者共收集了用药前后三个时间点的尿液样本进行质谱分析，尿液样本的详细信息和患者的临床症状见表 10。与用药前的蛋白质组的结果相比，一共鉴定到了种蛋白，经过筛选后共鉴定到 408 个差异蛋白，其中在 T1 和 T2 两个时间点分别鉴定到了 194 和 329 个差异蛋白（表 2）。在 T1 时间点，分别有 150 种上调和 44 种下调的差异蛋白；在第 T2 时间点，分别有 223 种上调和 106 种下调的差异蛋白。Venn 图显示了不同时间点的差异蛋白重叠情况（图 8A），共有 115 个蛋白在两个时间点发生了连续的变化，T1 和 T2 两个时间点独有的差异蛋白数量分别为 79 和 214 种。

对 T1 和 T2 两个时间点鉴定到的差异蛋白分别采用 DAVID 数据库进行功能富集分析。生物学过程方面的变化显示在两个时间点，一些共有的生物学过程发生了变化（表 10、图 8B），例如内肽酶活性的负调控、血小板脱粒、糖胺聚糖分解代谢过程、细胞蛋白质代谢过程、纤维蛋白溶解、碳水化合物代谢过程、一氧化氮生物合成过程的正调控、糖异生、常规糖酵解、糖酵解过程、蛋白水解、类维生素 A 代谢过程、细胞间粘附、糖胺聚糖代谢过程、谷胱甘肽代谢过程、急性期反应、ATP 生物合成过程、补体激活及经典途径、补体激活及替代途径、补体激活、白细胞与细胞的粘附和补体激活的调节等生物学过程。这些生物学过程包含了免疫反应和与肿瘤生长相关的反应。在第一次用药后采集的时间点 T1，糖酵解、糖异生和其他代谢相关的生物学过程变化较为显著，免疫反应的生物学过程也陆续被鉴定到，在此时间点病人病情评估稳定。在用药阶段的第二个时间点 T2，肿瘤生长相关的生物学过程变化程度显著，免疫学相关的生物学过程变

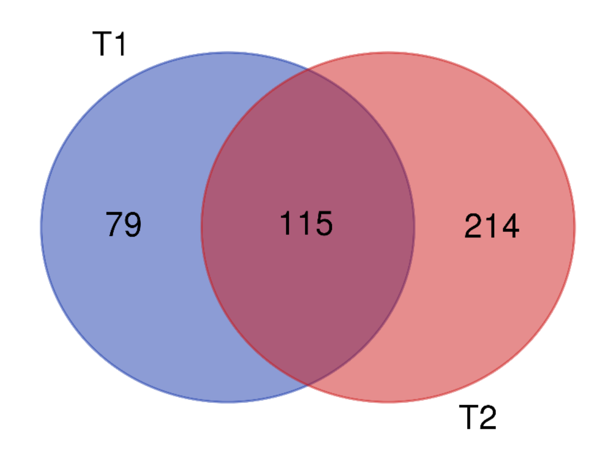
化程度与肿瘤相关的生物学过程变化程度相比较低，但变化的生物学过程数量较多。在此时间点病人病情评估稳定。

两个时间点的生物学过程变化结果表明，在整体治疗过程中，肿瘤的代谢生物学过程变化在整体变化中较为显著，这和患者临床病情评估稳定的趋势相符合，表明使用药物培美曲塞加顺铂的联合治疗对患者有一定疗效，可能该药物疗效还需要后续观察。

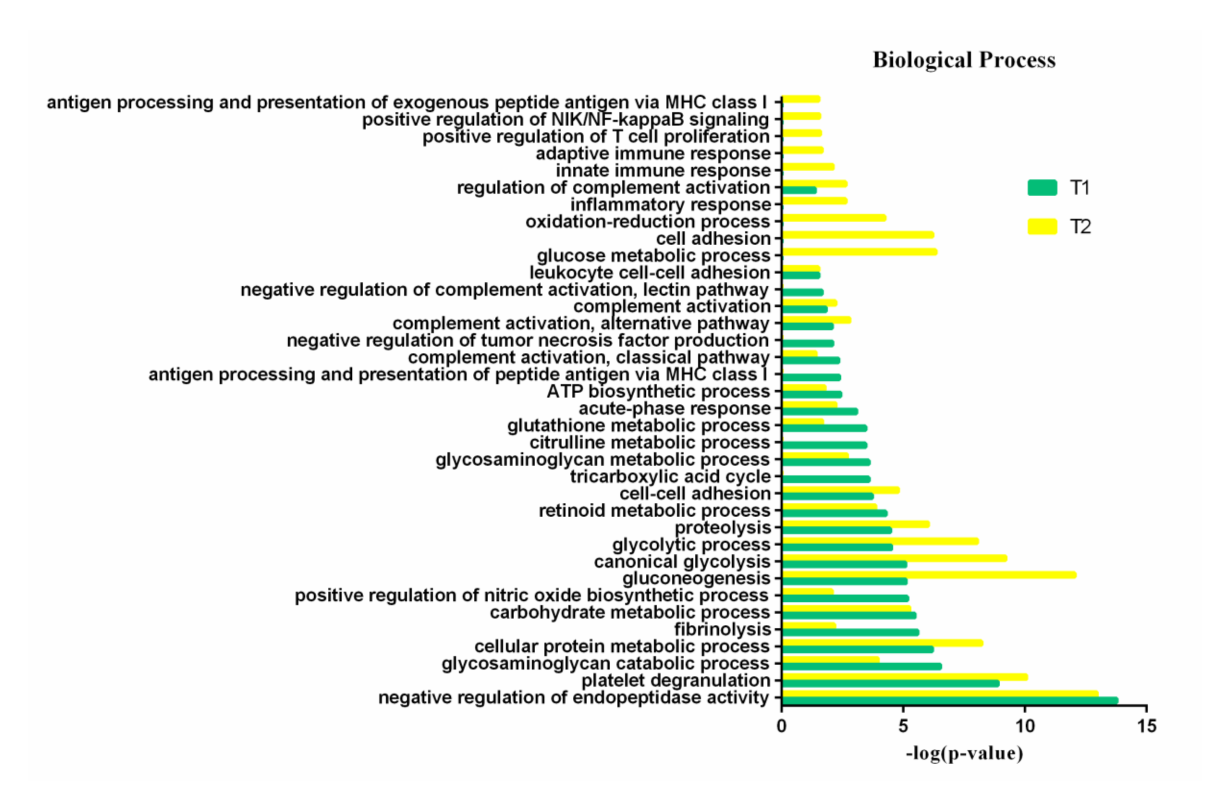
表 10 患者 P8 的尿液样本收集情况和变化的生物学过程。

尿液收集时间	靶病灶长度	非靶病灶	总体疗效评估	临床表现	用药时间	用药情况	变化显著的生物学过程（部分）
CON (2019.01.25)	110.4	存在	基线期	体检发现，劳累后粘痰	无	无	无
T1 (2019.03.09)	106.9	存在	SD	骨髓抑制，化疗药物减量，继续化疗病情，评估稳定	2019.02.14	培美曲塞：906 毫克（第一天）；顺铂：136 毫克（第一天）	T1: 内肽酶活性的负调控、血小板脱粒、糖胺聚糖分解代谢过程、细胞蛋白质代谢过程、纤维蛋白溶解、碳水化合物代谢过程、一氧化氮生物合成过程的正调控、糖异生、常规糖酵解、糖酵解过程、蛋白水解、类维生素 A 代谢过程、细胞间粘附、三羧酸循环、糖胺聚糖代谢过程、瓜氨酸代谢过程、谷胱甘肽代谢过程、急性期反应、ATP 生物合成过程、通过 I 类 MHC 进行抗原加工和肽抗原呈递、补体激活，经典途径、肿瘤坏死因子产生的负调控、补体激活，替代途径、补体激活、补体激活，凝集素途径的负调控、白细胞与细胞的粘附
T2 (2019.04.09)	106.7	存在	SD	病情评估稳定	2019.03.29	培美曲塞：680 毫克（第一天）；顺铂：136 毫克（第一天）	T2：内肽酶活性的负调控、血小板脱粒、糖胺聚糖分解代谢过程、细胞蛋白质代谢过程、纤维蛋白溶解、碳水化合物代谢过程、一氧化氮生物合成过程的正调控、糖异生、常规糖酵解、糖酵解过程、蛋白水解、类维生素 A 代谢过程、细胞间粘附、糖胺聚糖代谢过程、谷胱甘肽代谢过程、急性期反应、ATP 生物合成过程、补体激活，经典途径、补体激活，替代途径、补体激活、白细胞与细胞的粘附、葡萄糖代谢过程、细胞粘附、氧化还原过程、炎症反应、补体激活的调节、先天免疫反应、适应性免疫反应、T 细胞增殖的正调控、NIK / NF-kappaB 信号的正调控、通过 II 类 MHC 进行抗原加工和外源肽抗原的呈递

SD: Stable Disease，代表疾病稳定。



A



B

图 8 患者 P8 的蛋白变化情况和功能分析。A）T1 和 T2 两个时间点差异蛋白的韦恩图。B）T1 和 T2 两个时间点的差异蛋白的生物过程。

4. 结论

在这项研究中，当不同的肺癌患者使用不同的药物治疗后，通过对其尿蛋白质组的前后比较，发现（1）能够通过尿蛋白的变化反映不同药物治疗后患者的病理生理变化；（2））当不同患者使用相同药物治疗时，尿蛋白的变化能够反映出患者体内不同的病理生理变化，且和患者的临床病情评估结果较为一致。这些发现有可能在未来为辅助临床治疗提供重要信息。

References

1 Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394-424, doi:10.3322/caac.21492 (2018).

2 Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **25**, 16-27, doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0578 (2016).

3 Torre, L. A., Siegel, R. L. & Jemal, A. Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol* **893**, 1-19, doi:10.1007/978-3-319-24223-1_1 (2016).

4 Miller, K. D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* **66**, 271-289, doi:10.3322/caac.21349 (2016).

5 Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y. W. & Buchanan, P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta* **1856**, 189-210, doi:10.1016/j.bbcan.2015.08.002 (2015).

6 Vasconcellos, V. F. *et al.* Cisplatin versus carboplatin in combination with third-generation drugs for advanced non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **1**, CD009256, doi:10.1002/14651858.CD009256.pub3 (2020).

7 Seto, T. *et al.* Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* **15**, 1236-1244, doi:10.1016/S1470-2045(14)70381-X (2014).

8 Laskin, J. *et al.* Safety and efficacy of first-line bevacizumab plus chemotherapy in elderly patients with advanced or recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer: safety of avastin in lung trial (MO19390). *J Thorac Oncol* **7**, 203-211, doi:10.1097/JTO.0b013e3182370e02 (2012).

9 Tassinari, D. *et al.* Bevacizumab in the treatment of advanced, non-squamous non-small cell lung cancer: an evidence-based approach. *Oncology* **80**, 350-358, doi:10.1159/000328781 (2011).

10 La-Beck, N. M., Nguyen, D. T., Le, A. D., Alzghari, S. K. & Trinh, S. T. Optimizing Patient Outcomes with PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors for the First-Line Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharmacotherapy*, doi:10.1002/phar.2364 (2020).

11 Herbst, R. S. *et al.* Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1540-1550, doi:10.1016/S0140-6736(15)01281-7 (2016).

12 YouHe, G. Urine—an untapped goldmine for biomarker discovery? *Science China (Life Sciences)*, 10 (2013).

13 Zhao, M., Wu, J., Li, X. & Gao, Y. Urinary candidate biomarkers in an experimental autoimmune myocarditis rat model. *J Proteomics* **179**, 71-79, doi:10.1016/j.jprot.2018.02.032 (2018).

14 Zhang, F., Wei, J., Li, X., Ma, C. & Gao, Y. Early Candidate Urine Biomarkers for Detecting

Alzheimer's Disease Before Amyloid-beta Plaque Deposition in an APP (swe)/PSEN1dE9 Transgenic Mouse Model. *J Alzheimers Dis* **66**, 613-637, doi:10.3233/JAD-180412 (2018).

15 Zhang, F., Ni, Y., Yuan, Y., Yin, W. & Gao, Y. Early urinary candidate biomarker discovery in a rat thioacetamide-induced liver fibrosis model. *Science China Life Sciences* **61**, 1369-1381 (2018).

16 Ni, Y., Zhang, F., An, M., Yin, W. & Gao, Y. Early candidate biomarkers found from urine of glioblastoma multiforme rat before changes in MRI. *Sci China Life Sci* **61**, 982-987, doi:10.1007/s11427-017-9201-0 (2018).

17 Wu, J., Li, X. & Gao, Y. Early detection in urinary proteome for the effective early treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a rat model. *Proteomics Clin Appl* **11**, 11-12 (2017).

18 Zhang, L., Li, Y. & Gao, Y. Early changes in the urine proteome in a diethyldithiocarbamate-induced chronic pancreatitis rat model. *Journal of proteomics* **186**, 8-14 (2018).

19 Yameng, Z., Yufei, G. & Youhe, G. Early changes in the urine proteome in a rat liver tumor model. *bioRxiv*, 568246 (2019).

20 Zhang, L., Li, Y., Meng, W., Ni, Y. & Gao, Y. Dynamic urinary proteomic analysis in a Walker 256 intracerebral tumor model. *Cancer Med* **8**, 3553-3565, doi:10.1002/cam4.2240 (2019).

21 Gao, Y. *Urine: Promising Biomarker Source for Early Disease Detection*. (Springer, 2019).

22 Amin M, E. S. G. F. S. R. G. W. M. e. a. AJCC cancer staging manual. 8th edition *New York, NY: Springer* (2017).

23 Eisenhauer, E. A. *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* **45**, 228-247, doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026 (2009).

24 Wisniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* **6**, 359-362, doi:10.1038/nmeth.1322 (2009).

25 Grasmann, G., Smolle, E., Olschewski, H. & Leithner, K. Gluconeogenesis in cancer cells - Repurposing of a starvation-induced metabolic pathway? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1872**, 24-36, doi:10.1016/j.bbcan.2019.05.006 (2019).

26 Kubes, P. The enigmatic neutrophil: what we do not know. *Cell Tissue Res* **371**, 399-406, doi:10.1007/s00441-018-2790-5 (2018).

27 Chaturvedi, S., Hoffman, R. M. & Bertino, J. R. Exploiting methionine restriction for cancer treatment. *Biochem Pharmacol* **154**, 170-173, doi:10.1016/j.bcp.2018.05.003 (2018).

28 Chen, K. *et al.* Genetic variants in RUNX3, AMD1 and MSRA in the methionine metabolic pathway and survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Int J Cancer* **145**, 621-631, doi:10.1002/ijc.32128 (2019).

29 Yang, M. & Vousden, K. H. Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer* **16**, 650-662, doi:10.1038/nrc.2016.81 (2016).

30 Cavallaro, U. & Christofori, G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta* **1552**, 39-45, doi:10.1016/s0304-419x(01)00038-5 (2001).

31 Lawrence, T., Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R. & Willoughby, D. A. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* **7**, 1291-1297, doi:10.1038/nm1201-1291 (2001).

32 Duchartre, Y., Kim, Y. M. & Kahn, M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol*

Hematol **99**, 141-149, doi:10.1016/j.critrevonc.2015.12.005 (2016).
33 Yang, Y., Sun, M., Wang, L. & Jiao, B. HIFs, angiogenesis, and cancer. *J Cell Biochem* **114**, 967-974, doi:10.1002/jcb.24438 (2013).
34 Perrotta, C. *et al.* Nitric Oxide Generated by Tumor-Associated Macrophages Is Responsible for Cancer Resistance to Cisplatin and Correlated With Syntaxin 4 and Acid Sphingomyelinase Inhibition. *Front Immunol* **9**, 1186, doi:10.3389/fimmu.2018.01186 (2018).
35 Dobrotkova, V., Chlapek, P., Mazanek, P., Sterba, J. & Veselska, R. Traffic lights for retinoids in oncology: molecular markers of retinoid resistance and sensitivity and their use in the management of cancer differentiation therapy. *BMC Cancer* **18**, 1059, doi:10.1186/s12885-018-4966-5 (2018).
36 Kwaan, H. C. & Lindholm, P. F. Fibrin and Fibrinolysis in Cancer. *Semin Thromb Hemost* **45**, 413-422, doi:10.1055/s-0039-1688495 (2019).
37 DeBerardinis, R. J. & Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* **2**, e1600200, doi:10.1126/sciadv.1600200 (2016).
38 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
39 Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* **23**, 27-47, doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006 (2016).
40 Cukier, P., Santini, F. C., Scaranti, M. & Hoff, A. O. Endocrine side effects of cancer immunotherapy. *Endocr Relat Cancer* **24**, T331-T347, doi:10.1530/ERC-17-0358 (2017).
41 Quezada, S. A. & Peggs, K. S. Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. *Br J Cancer* **108**, 1560-1565, doi:10.1038/bjc.2013.117 (2013).